

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЮ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ СТИМУЛЯЦИИ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫМИ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ *IN VITRO*

Е. М. Назаренко^{1), 2)}, Г. И. Иванчик²⁾, Н. А. Манаева²⁾, Д. Б. Нижегородова^{1), 2)}

¹⁾ Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь, kaf_immunal@iseu.by

²⁾ Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины Белорусского государственного медицинского университета, пр. Дзержинского, 83, 220083, г. Минск, Беларусь, el.m.nazarenko@gmail.com

Короткоцепочечные жирные кислоты являются важным метаболитом микробиоты кишечника, поддерживающие гомеостаз иммунной системы человека. В последнее время появляется все больше исследований *in vivo* и *in vitro*, направленных на изучение возможности использования короткоцепочечных жирных кислот для функционального моделирования иммунных клеток. В данной статье представлен методологический подход к иммунофенотипированию лимфоидных клеток в условиях стимуляции короткоцепочечными жирными кислотами *in vitro*. На основе разработанного методологического подхода выявлено увеличение количества TNK-клеток в культуре в условиях стимуляции бутиратом за счет незрелых CD27-CD11b⁻ TNK-лимфоцитов, что может быть использовано для улучшения методов экспансии данных клеток *in vitro*.

Ключевые слова: метаболиты микробиоты; короткоцепочечные жирные кислоты; бутират; NK-клетки; TNK-клетки; иммунофенотип; проточная цитометрия.

METHODICAL APPROACH TO THE IMMUNOPHENOTYPING OF LYMPHOID CELLS UNDER STIMULATION WITH SHORT-CHAIN FATTY ACIDS *IN VITRO*

Е. М. Nazaranka^{1), 2)}, H. I. Ivanchyk²⁾, N. A. Manaeva²⁾, D. B. Nizheharodava^{1), 2)}

¹⁾ International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Dolgobrodskaya str., 23/1, 220070, Minsk, Belarus, kaf_immunal@iseu.by

²⁾ Scientific Research Institute of Experimental and Clinical Medicine of Belarusian State Medical University, Dzerzhinsky Ave., 83, 220083, Minsk, Belarus, el.m.nazarenko@gmail.com

Short-chain fatty acids are an important metabolite of the intestinal microbiota that support the homeostasis of the human immune system. Recently, there has been an increasing number of *in vivo* and *in vitro* studies aimed at exploring the possibility of using short-chain fatty acids for functional modeling of immune cells. This article presents a methodological approach to immunophenotyping of lymphoid cells under conditions of stimulation with short-chain fatty acids *in vitro*. Based on the developed methodological approach, an increase in the number of TNK cells in culture was revealed under conditions of butyrate stimulation due to immature CD27-CD11b⁻ TNK lymphocytes, which can be used to improve the methods of expansion of these cells *in vitro*.

Keywords: microbiota metabolites; short-chain fatty acids; butyrate; NK cells; NKT cells; immunophenotype; flow cytometry.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2025-1-212-216>

Введение. Важной метаболической активностью кишечной микробиоты является ферментация крахмала и клетчатки с образованием короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) в качестве конечного продукта. Основными КЦЖК являются ацетат, пропионат и бутират, ко-

торые продуцируются бактериями с разной скоростью. Концентрации в толстом кишечнике взрослого здорового человека варьирует: ацетат находится в диапазоне 20-43 ммоль/л, в то время как бутират и пропионат содержатся в концентрациях 6-15 и 6-13 ммоль/л, соответственно [1]. Разнообразие рациона, которое меняется в течение жизни, оказывает сильное влияние на количество и качество КЦЖК. В частности, концентрация ацетата выше на ранних стадиях жизни, поскольку это основной продукт метаболизма штаммов *Bifidobacteria*, характеризующих микробиоту кишечника младенца. Позже, вместе с окончанием грудного вскармливания, наблюдается увеличение численности *Firmicutes*, которые способны расщеплять сложные полисахариды и другие сахара посредством гидролиза, что приводит к образованию пропионата и бутирата [2].

Всасываясь в кишечнике, КЦЖК достигают других органов и выполняют регуляторные функции метаболизма глюкозы и жиров и контроля иммунной системы, подавляя воспалительные реакции. Реализация функций опосредована несколькими механизмами, включая ингибирование фермента гистондеацетилазы (HDAC), сигнализацию рецептора, связанного с G-белком (GPR), выработку ацетил-КоА и метаболическую интеграцию [3].

Недавние исследования показали, что противоопухолевая активность иммунных клеток может модулироваться микробиотой кишечника и ее метаболитами, что потенциально может быть полезным для лечения новообразований [4]. В частности, большой интерес представляет использование КЦЖК в терапии, основанной на *in vivo* усилении иммунного ответа пациентов со злокачественными опухолями. Иммунотерапия на основе NK- и TNK-клеток привлекает все больший интерес в области лечения рака. Поэтому определение потенциальных эффектов КЦЖК на NK- и TNK-клетки является перспективным направлением улучшения современных подходов иммунотерапии новообразований.

Цель исследования: разработать методологический подход к иммунофенотипированию лимфоидных клеток в условиях стимуляции короткоцепочечными жирными кислотами *in vitro*.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования являлись мононуклеары периферической крови (МПК) здоровых взрослых лиц (n=5) в возрасте 33,5 (23,5; 43,3) лет после получения информированного согласия. МПК выделяли путем центрифугирования разведенной в физиологическом растворе периферической крови на градиенте плотности Roti®Sep 1077 (Carl Roth, Германия).

МПК культивировали в 96-луночном U-образном планшете в концентрации 2×10^5 клеток на лунку в питательной среде RPMI-1640 (Gibco, Германия) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, Германия), 1% антибиотика-антимикотика (Gibco, Германия), 1 % L-глутамина (Gibco, США) в присутствии или отсутствии (контроль) натриевых солей ацетата (1 mM, Riedel-de Haën, Германия), пропионата (0,5 mM, Neos Ingredients, Россия) и бутирата (0,5 mM, Glentham Life Sciences, Великобритания) в CO₂-инкубаторе в течение 3-х суток в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °C. По окончании культивирования пробы окрашивали моноклональными антителами CD3-FITC и CD56-PE (Elabscience, Китай), CD27-PE/Cyanine7 (BioLegend, США) и CD11b-APC-A750 (Beckman Coulter, Франция) в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Учет результатов выполняли на 2000 CD56+ лимфоцитов с использованием проточного цитофлуориметра CytoFlex (Beckman Coulter, США) и программы CytExpert (версия 2.3.0.84, Beckman Coulter, США).

Визуализацию и статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8 («GraphPad Software Inc.», США). Для описания данных использовали значение медианы, 25 % и 75 % процентилей: Me (25 %; 75 %). Определение различий для зависимых переменных осуществляли с помощью непараметрического критерия Вилкоксона (p (W)); результаты принимали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Анализ воздействия основных КЦЖК выявил наилучшую тенденцию ответа NK- и TNK-клеток в условиях стимуляции бутиратом (рис. 1), что соотносится с литературными данными о преобладающем влиянии бутирата на физиологические реакции среди остальных КЦЖК [2]. Исходя из этого, дальнейшее функциональное иммунофенотипирование NK- и TNK-клеток проводилось для культур МПК, культивируемых в присутствии бутирата.

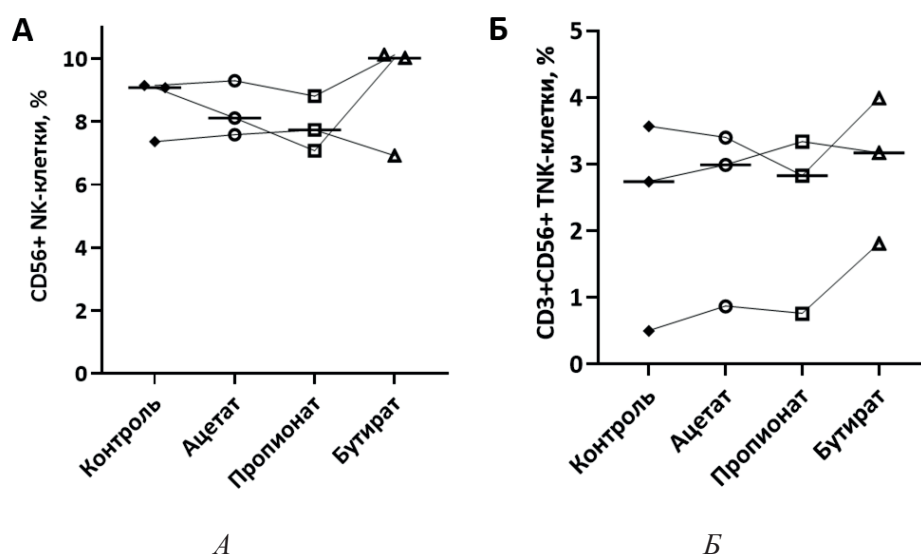


Рис. 1. Изменение количества NK- и TNK-клеток в культурах МПК здоровых лиц под воздействием исследуемых КЦЖК (полоской отмечены медианы):
 А – количество CD56⁺ NK-клеток; Б – количество CD3⁺CD56⁺ TNK-клеток

Различные исследования мышиных и человеческих NK-клеток показывают, что процесс их развития можно разделить по экспрессии маркеров CD27 и CD11b на 4 стадии, связанных с прогрессивным приобретением эффекторных функций: CD27–CD11b– → CD27+CD11b– → CD27+CD11b+ → CD27–CD11b+ [5]. На рисунке 2 представлена стратегия гейтирования лимфоидных клеток для определения субпопуляций NK- и TNK-клеток на основании экспрессии маркеров CD27 и CD11b. Первоначально для исключения из анализа дублетных клеток на графике высоты импульса прямого светорассеяния (FSC-H) против площади прямого светорассеяния (FSC-A) выделялась область одиночных лейкоцитов (single cells, рис. 2А), и далее обозначался гейт лимфоидных клеток (lymphocytes) в координатах площади прямого (FSC-A) и бокового светорассеяния (SSC-A, рис. 2Б). Популяции NK- и TNK-клеток определялись на точечном графике среди всех лимфоцитов как CD3–CD56+ и «двойные позитивные» CD3+CD56+, соответственно (рис. 2В), после чего гейты применялись к графикам с комбинацией маркеров CD27 и CD11b (рис. 2Г и 2Д).

В таблице отражена характеристика влияния бутирата на лимфоидные клетки в культуре МПК здоровых лиц. Выявлено увеличение количества NK-клеток без статистической значимости ($p=0,250$) и значительный рост популяции TNK-клеток ($p=0,008$) в условиях стимуляции бутиратом по сравнению с контролем. Полученные данные согласуются с недавними исследованиями Pérez et al., которые показали увеличение пролиферации NK-клеток линии NK-92 в присутствии 2 мкМ бутирата в культуре *in vitro* [4]. Аналогичные данные по влиянию бутирата на TNK-клетки в литературе отсутствуют, как и не описаны субпопуляционные изменения CD27/CD11b NK- и TNK-клеток в ответ на действие КЦЖК.

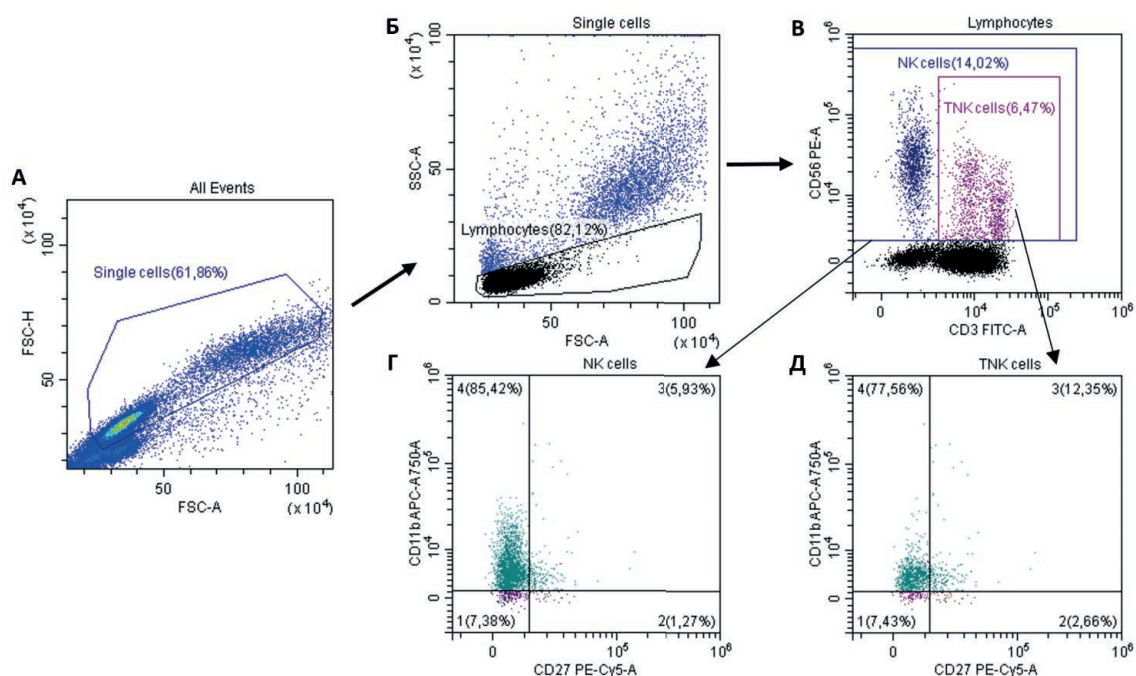


Рис. 2. Анализ субпопуляций NK- и TNK-клеток методом проточной цитометрии:

- А – область одиночных лейкоцитов (single cells); Б – область лимфоцитов (lymphocytes);
 В – области CD56⁺ NK- и CD3⁺CD56⁺ TNK-клеток (NK cells и TNK cells); Г и Д – гейтирование субпопуляций NK- и TNK-клеток по экспрессии маркеров CD27 и CD11b:
 1 – «двойные негативные» клетки CD27⁻CD11b⁻, 2 – субпопуляция CD27⁺CD11b⁻,
 3 – «двойные позитивные» клетки CD27⁺CD11b⁺, 4 – субпопуляция CD27⁻CD11b⁺

Установлено, что наибольшее количество NK- и TNK-клеток в культуре МПК являлись CD27⁻CD11b⁺, что соответствует данным других авторов о распределении субпопуляций в организме. У NK- и TNK-клеток наблюдались схожие тенденции в ответе на стимуляцию бутиратом: увеличение субпопуляции незрелых CD27⁻CD11b⁻ клеток ($p=0,002$) и снижение цитокин-продуцирующих CD27⁺CD11b^{-/+} ($p=0,002$) без статистически значимых изменений в эффекторных CD27⁻CD11b⁺ ($p=0,070$ и $p=0,365$, соответственно). Таким образом, количественное увеличение TNK-клеток (тенденция у NK-клеток) в условиях стимуляции бутиратом происходило за счет индукции незрелой CD27⁻CD11b⁻ субпопуляции.

Влияние бутирата на субпопуляционный состав NK- и TNK-клеток в культуре МПК

Популяции лимфоидных клеток		Условия культивирования		p(W)
		Бутират		
Контроль				
CD56 ⁺ NK-клетки, %		9,4 (8,7; 12,8)	10,5 (9,2; 14,5)	p=0,250
CD3 ⁺ CD56 ⁺ TNK-клетки, %		3,2 (1,4; 5,0)	3,6 (2,6; 6,1)	p=0,008
CD56 ⁺ NK-клетки	CD27 ⁻ CD11b ⁻ , %	7,4 (6,7; 9,3)	9,4 (9,3; 13,0)	p=0,002
	CD27 ⁺ CD11b ^{-/+} , %	8,4 (7,9; 9,8)	7,8 (6,5; 8,7)	p=0,002
	CD27 ⁻ CD11b ⁺ , %	85,3 (81,5; 85,4)	83,0 (78,4; 84,2)	p=0,070
CD3 ⁺ CD56 ⁺ TNK-клетки	CD27 ⁻ CD11b ⁻ , %	15,8 (11,6; 19,9)	24,3 (18,2; 27,2)	p=0,002
	CD27 ⁺ CD11b ^{-/+} , %	21,7 (18,4; 42,3)	16,6 (12,8; 27,8)	p=0,002
	CD27 ⁻ CD11b ⁺ , %	62,5 (38,1; 70,0)	59,1 (44,9; 69,0)	p=0,365

Согласно литературным данным каждая субпопуляция может быть охарактеризована уникальными функциональными и фенотипическими признаками: CD27⁺CD11b⁻ и CD27⁺CD11b⁺ НК-клетки обладают высокой способностью секретировать цитокины, CD27⁻CD11b⁺ демонстрируют высокую цитотоксическую функцию, а «двойной негатив» CD27⁻CD11b⁻ указывает на незрелый фенотип, экспрессируя высокие проценты активирующего рецептора NKG2A. Показано, что порядка 6% НК-клеток периферической крови экспрессируют CD27, 14% CD27⁺ НК-клеток существуют в костном мозге, и >30% CD27⁺ НК-клеток находятся в селезенке и миндалинах. Более 90% НК-клеток периферической крови относятся к популяции CD27⁻CD11b⁺, тогда как НК-клетки из пуповинной крови имеют популяции, которые составляют 80% CD27⁻CD11b⁺ и 20% CD27⁺CD11b⁺. По сравнению с этим, НК-клетки децидуальной оболочки плаценты более незрелые, почти 60% из них имеют «двойной негативный» фенотип CD27⁻CD11b⁻ [6]. НК-клетки из инфильтрирующих опухоль тканей также показали высокое содержание субпопуляции CD27⁻CD11b⁻, однако механизм индукции незрелых НК-клеток в опухолевом микроокружении до конца не выявлен [7].

Заключение. В ходе исследования был разработан методологический подход к иммунофенотипированию лимфоидных клеток в условиях стимуляции короткоцепочечными жирными кислотами *in vitro*. Показано увеличение количества ТНК-клеток в условиях стимуляции бутиратом за счет субпопуляции незрелых CD27⁻CD11b⁻ ТНК-клеток. Дальнейшее выяснение механизмов подобной пролиферации ТНК-клеток под воздействием бутирата является перспективным направлением в изучении ответа лимфоидных клеток на влияние КЦЖК и использовании метаболитов микробиоты в моделировании функционального профиля лимфоцитов для практического использования.

Библиографические ссылки

1. Use of Short-Chain Fatty Acids for the Recovery of the Intestinal Epithelial Barrier Affected by Bacterial Toxins / D. Pérez-Reytor [et al.] // Front. Physiol. 2021. Vol. 12, art. 650313. P. 1–8.
2. Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota / W. Fusco [et al.] // Nutrients. 2023. Vol. 15, art. 2211. P. 1–22.
3. Regulation of short-chain fatty acids in the immune system / Liu X-f [et al.]. Front. Immunol. 2023.14:1186892.
4. Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Boost Antitumoral Natural Killer Cell Activity / M. Pérez [et al.] // J. Clin. Med. 2024. Vol. 13, art. 3885. P. 1–12.
5. Liver-infiltrating CD11b⁻CD27⁻ NK subsets account for NK-cell dysfunction in patients with hepatocellular carcinoma and are associated with tumor progression // Q.F Zhang [et al.] // Cell Mol Immunol. 2017. Vol. 14. P.819–829.
6. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects / B. Fu [et al.] // Immunology. 2014. Vol. 141. P. 483–489.
7. CD11b⁻CD27⁻ NK Cells Are Associated with the Progression of Lung Carcinoma / J. Jin [et al.] // PLOS ONE. 2013. Vol. 8(4), art. e61024. P. 1–11.